

Entomopatogene nematode u biološkoj zaštiti bilja

Sažetak

Biološka kontrola podrazumijeva upotrebu prirodnih neprijatelja u suzbijanju štetnih organizama. Jedna od grupa prirodnih neprijatelja insekata entomopatogene su nematode iz porodica Steinernematidae i Heterorhabditidae i njihovi bakterijski simbionti iz rodova *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*. U tom mutualističkom odnosu i nematode i bakterije imaju svoj doprinos u uspješnom parazitiranju domaćina. Iako se vrlo lako uzgajaju na mnogim insektima u in vivo uvjetima, do njihove masovne primjene u suzbijanju štetnih insekata došlo je razvojem metoda uzgoja u tekućim fermentorima u in vitro uvjetima čime je omogućena proizvodnja velikih količina, a istovremeno je smanjena cijena preparata čime su postale konkurentnije u odnosu na sintetičke pesticide. Osim toga pritisak javnog mnijenja i promjena legislative uzrokuju stalno smanjenje primjene sintetičkih pesticida, a povećanje preparata za biološku kontrolu, među kojima su i nematode. Prednost je entomopatogenih nematoda u tome što mogu aktivno tražiti domaćina, nisu štetni za čovjeka i druge sisavce, imaju minimalan utjecaj na korisne organizme, lako se primjenjuju, a u mnogim zemljama izuzete su od registracije. Sve je to rezultiralo uspješnom primjenom u kontroli mnogih štetnih insekata u poljoprivrednoj proizvodnji.

Glavne riječi: entomopatogene nematode, *Steinernema*, *Heterorhabditis*

Uvod

Biološka kontrola podrazumijeva upotrebu prirodnih neprijatelja u suzbijanju štetnih organizama. Prirodni neprijatelji prisutni su u prirodi, ali je za njihovo djelovanje u agroekosustavima potrebno izvršiti njihovu introdukciju ili redovno primjenjivati kada se za to ukaže potreba. Jedna od grupa prirodnih neprijatelja insekata su i neke grupe nematoda. Nematode su vrlo raznovrsna, brojna i široko rasprostranjena skupina životinja. Ti valjkasti crvi iako posjeduju dosta sličnu opću anatomiju, razlikuju se u građi usnog aparata koji ukazuje na raznovrsne načine ishrane kao što su bakteriovorne, fungivorne, fitoparazine, paraziti životinja, predatori i svejedi (Yeates, 1993). Nematode se mogu naći u gotovo svim ekološkim sustavima na kopnu, slatkoj vodi ili moru. Do sada je opisano više od 30 000 vrsta, ali smatra se da je ukupan broj između 500 000 i milijun (Gaugler & Bilgrami, 2004).

Nematode povezane s insektima opisane su u više od 30 porodica (Stock & Hunt, 2005). Međutim potencijal za biološku kontrolu prisutan je u sedam porodica: Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Rhabditidae, Steinernematidae i Heterorhabditidae. Potencijal nematoda kao agenasa za biološku kontrolu nije prisutan isključivo u kontroli insekata. Postoji komercijalni preparat za kontrolu puževa napravljen od vrste nematoda *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Wilson & Gaugler, 2000), dok su utvrđeni potencijali predatorskih i fungivornih nematoda u kontroli fitoparazitnih nematoda i fitopatogenih gljiva (Choudhury & Sivakumar, 2000).

Najveću pažnju kao agensi za biološku kontrolu privukle su nematode iz dvije porodice- Steinernematidae i Heterorhabditidae, koje su poznate i kao entomopatogene nematode (EPN). Iako je prva vrsta entomopatogenih nematoda opisana prije gotovo 100 go-

¹ Mr. Branimir Nježić, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, Bulevar vojvode Petra Bojovića 1A, 78 000 Banja Luka, Bosna i Hercegovina
branimir.njezic@agrofabl.org

dina (*Steinernema kraussei*) masovna aplikacija u kontroli štetnih insekata počela je prije tridesetak godina. Istraživanja koja su dovela do boljeg razumijevanja biologije nematoda, kruga domaćina, proces parazitiranja insekata kao i nepredak u području tehnologije kao što je proizvodnja, formulacija, skladištenje te metode i uvjeti primjene doveli su do eksponencijskog rasta upotrebe tih organizama za biološku kontrolu (Arthurs et al., 2004). Osim važnih znanstvenih i tehnoloških otkrića širenju masovne primjene entomopatogenih nematoda pridonio je i status koji omogućava u mnogim zemljama primjenu bez registracije, zasnovanu na dugogodišnjim rezultatima koji su pokazali da te nematode nisu štetne za ljude, sisavce te biljke i životnu sredinu (Ehlers, 2005). Njihova uspješnost u kontroli štetnih insekata zasnovana je na mutualističkom odnosu u kojem nematoda traži domaćina i u svom probavnom sustavu nosi bakteriju koja će biti smrtonosna za insekta.

U porodici Steinernematidae nalazi se rod *Steinernema*, a u porodici Heterorhabditidae rod *Heterorhabditis*. Na osnovi literaturnih izvora Hunt (2007) je potvrdio 55 vrsta u porodici Steinernematidae i 11 u porodici Heterorhabditidae. Iako vrste rodova *Steinernema* i *Heterorhabditis* pripadaju dvjema različitim porodicama, ipak imaju neke zajedničke karakteristike. Jedini stadij koji u svom probavnom sustavu nosi bakterije je dauerni juvenil (DJ) koji je ujedno i jedini infektivni stadij. Bakterijski simbionti iz rodova *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* vrlo su povezani s vrstama iz porodica Steinernematidae i Heterorhabditidae. U tom mutualističkom odnosu nematode štite bakterije od uvjeta vanjskog okruženja, a u nekim slučajevima i onemogućuju imuni sustav domaćina, dok bakterije ubijaju domaćina, predstavljaju izvor hrane za nematode i inhibiraju razvoj drugih bakterija. DJ je jedini stadij koji može preživjeti duže vrijeme izvan domaćina. Među različitim vrstama nematoda postoji razlika u pronalaženju domaćina – od krajnje pasivnih i statičnih vrsta koje čekaju insekta i onih vrsta koje se aktivno kreću u potrazi za domaćinom.

Razmnožavanje

Vrste rodova *Steinernema* i *Heterorhabditis* razlikuju se i u načinu razmnožavanja. Dok vrste roda *Heterorhabditis* imaju i hermafroditne jedinke i klasične amfimiktične jedinke koje imaju i mužjake i ženke, kod vrsta roda *Steinernema* prisutni su i mužjaci i ženke te se razmnožavaju amfimiksisom odnosno postoji kopulacija među jedinkama iako je utvrđeno da postoji barem jedan izuzetak (Griffin et al., 2001). Zbog toga kod vrsta roda *Heterorhabditis* jedna jedinka DJ može izvršiti uspješnu infekciju razmnožavanjem dok su kod *Steinernema* potrebne najmanje dvije individue različitog spola. Većina mladih u tijelu hermafroditne ženke iz roda *Heterorhabditis* izliježe se iz jajeta unutar majčina tijela te se hrani na unutrašnjim organima uzrokujući majčinu smrt (Johnigk & Ehlers, 1999.). Ta je pojava je uobičajena kod rabditida i naziva se endotokija matricida. Na taj si način mladi osiguravaju dosta energije koja im je dovoljna do odraslog stadija koji prelazi u amfimiktičan način razvoja. DJ iz obje porodice mogu zadržati kutikulu prethodnog životnog stadija, ali se kod Steinernematidae mnogo lakše odvaja i kretanjem kroz zemljište gubi (Campbell & Gaugler, 1991.).

Uspješno parazitiranje insekata zavisi od insekta domaćina, nematode i bakterije. Insekt može iskazati rezistentnost prema određenim nematodama i njihovim bakterijskim simbiontima, dok virulentni faktori nematode i bakterije mogu djelovati pojedinačno ili zajednički (Griffin et al. 2005). Nematode u tijelo insekta ulaze kroz prirodne otvore kao što su usta ili anus i izravno kroz kutikulu.

Prirodne populacije EPN u suzbijanju štetnih organizama

Kapacitet populacija entomopatogenih nematoda koje se nalaze u prirodi u kontroli štetnih insekata vrlo je ograničen i uglavnom se radi o uravnoteženom odnosu između populacija insekata i nematoda. Međutim, agrotehničkim mjerama moguće je poboljšati djelotvornost ili perzistentnost populacija entomopatogenih nematoda na poljoprivrednim površinama. Održavanje visoke brojnosti entomopatogenih nematoda moguće je samo ako je prisutna visoka brojnost insekata domaćina (Glaser & Farrell, 1935).

Uzgoj

Više od pola stoljeća prošlo je od opisa prve vrste entomopatogenih nematoda pa do početka njihove masovne primjene u biološkoj kontroli, a uzrok tome je pojava jeftinih pesticida širokog spektra djelovanja koji su potisnuli sredstva za biološku zaštitu biljaka. Od početka osamdesetih godina prošlog stoljeća tehnologija masovne proizvodnje entomopatogenih nematoda doživjela je procvat zbog razvoja jeftinih metoda uzgoja nematoda u *in vitro* fermentorima velikih kapaciteta, ali se istovremeno dogodio veliki pritisak na smanjenje upotrebe pesticida ili zamjenu biološkim preparatima zbog pojave rezistentnosti, ostataka pesticida u hrani i njihova negativnog utjecaja na životnu sredinu.

Za potrebe biološke kontrole entomopatogene nematode mogu biti uzgojene *in vivo* ili *in vitro* (Ehlers & Shapiro-Ilan, 2005). *In vivo* uzgoj obavlja se na larvama voskova moljca što je jeftin način, ali ograničenih kapaciteta i zahtjevan što se tiče radne snage. Ta je metoda pogodna za male površine ili ispitivanja. Uzgoj *in vitro* može biti u čvrstom ili tekućem mediju. Uzgoj u čvrstom mediju pogodan je za tržišta srednjih veličina jer su ulaganja relativno mala, ali su ipak veći troškovi radne snage. Uzgoj nematoda u tekućim fermentorima je najintenzivniji i najjeftiniji način proizvodnje koji karakterizira visok nivo tehnologije i visoka početna ulaganja. Najčešće korištene komercijalne vrste nematoda su: *Steinernema carpocasmae*, *Steinernema feltiae* i *Heterorhabditis bacteriophora*, ali i *Steinernema kushidai*, *Steinernema riobrave*, *Steinernema scapterisci*, *Heterorhabditis indica* i *Heterorhabditis megidis*.

Aplikacija

Aplikacija entomopatogenih nematoda zavisi od poljoprivredne kulture u kojoj se primjenjuje i ciljane štetočine. Entopatogene nematode mogu biti primijenjene bilo kojom opremom za aplikaciju sredstava za zaštitu biljaka pa čak u nekim slučajevima i sustavima za navodnjavanje ako se zadovolje određeni uvjeti. Pri tome treba voditi računa o miješanju, tipu mlaznica, pritisku i temperaturi. Specifična gustoća tijela nematoda je $1,05 \text{ g/cm}^3$ što znači da se u vodenoj otopini polako talože te je potrebno osigurati kontinuirano miješanje. Otvori mlaznica trebali bi biti veći od $500 \mu\text{m}$, a sita treba ukloniti. Neke vrste entomopatogenih nematoda mogu izdržati pritiske i do 20 bara, ali u pravilu prilikom aplikacije pritisak ne bi trebao biti veći od 10 bara. Temperatura vodene otopine u spremniku i mlaznicama ne smije prijeći 30°C , pri čemu treba imati u vidu da će pumpa za miješanje i sunčeve zrake povećati temperaturu radne otopine. Entomopatogene nematode obično se apliciraju u dozi od $2.5 \times 10^9 \text{ DJ/ha}$ ili većoj (Shapiro-Ilan et al., 2012). Zemljišni živi svijet može imati pozitivan, neutralan ili negativan utjecaj na djelotvornost nematoda (Kaya, 2002). Interakcija s drugim agensima za biološku kontrolu može biti sinergistična, kao u slučaju *Bacillus tunigiensis* (Koppenhöfer & Kaya, 1997) i *Metharidium anisopliae* (Ansari et al., 2004), ali također i antagonistična, kao u slučaju *Bauveria bassiana* (Brinkman & Gardner, 2000.). Budući da su nematode vodeni organizmi, njihovo je djelovanje bolje

u vlažnim zemljištima. Međutim, optimalna vlažnost zemljišta zavisi od vrste nematoda i tipa zemljišta (Koppenhöfer et. al., 1995). Slično kao i kod interakcije sa živim organizmima, interakcija s pesticidima je u zavisnosti od vrste nematode, ali i aktivne tvari, doze i vremena aplikacije, premda u većini slučajeva ne postoji inhibitorski utjecaj pesticida na djelovanje nematoda (Koppenhöfer & Grewal, 2005).

Prednosti upotrebe

Detaljan pregled sigurnosti i legislative vezane za upotrebu entomopatogenih nematoda izradio je Elers (2005.). Entomopatogene nematode nemaju štetan utjecaj na ljude koji se bave njihovom proizvodnjom ili aplikacijom, a nisu štetne ni za životnu sredinu. Gotovo da ne mogu imati negativan utjecaj na ne ciljane organizme u životnoj sredini jer nisu dugo aktivne. Introdukcija egzotičnih vrsta teško može dovesti do potpunog potiskivanja autohtonih populacija, ali može doći do privremenog smanjenja zbog kompeticijskog odnosa prema domaćinima. U većini slučajeva entomopatogene nematode svrstane su u grupu makroorganizama zajedno s predatorskim i parazitnim insektima te su u većini slučajeva izuzeti od registracije. U posljednjih nekoliko godina kemijske tvrtke koje su se tradicionalno bavile proizvodnjom i trgovinom sintetičkih pesticida, dolaze na tržište s proizvodima za biološku kontrolu, što je slučaj i s entomopatogenim nematodama.

Primjeri komercijalne upotrebe u suzbijanju štetnih insekata

Praktična primjena entomopatogenih nematoda detaljno je obrađena u preglednim radovima (Arthus et al., 2004, Grewal et al., 2005, Lacey & Georgis, 2012, Lacey et al., 2015). Entomopatogene nematode pokazale su visok nivo djelotvornosti u kontroli mnogih insekata. Većina uspješnih aplikacija u kontroli je insekata koji dio životnog ciklusa provode u zemljištu. Primjeri dobrih rezultata u kontroli štetnih organizama su *Hylobius abietis* L. (Williams et al., 2013), *Grapholita molesta*, (Riga et al., 2006), *Aethina tumida* (Shapiro-Ilan et al., 2010), *Diabrotica virgifera virgifera* (Toepfer et al., 2008). Primjeri uspješne kontrole štetnih insekata koji žive na skrovitim mjestima su *Capnodis tenebrionis* (Garcia del Pino and Morton, 2005) i *Synanthedon exitiosa* (Shapiro-Ilan, 2009). U kontroli štetočina u zaštićenom prostoru postoji nekoliko primjera komercijalne primjene entomopatogenih nematode: *Bemisia tabaci*, (Cuthbertson et al., 2007), *Plutela xylostella* (Schroer and Ehlers, 2005), *Tuta absoluta* (Batalla-Carera et al. 2010), *Frankliniella occidentalis* (Premachandra et al., 2003), Diptera: Sciaridae (Tomalek et al., 2005). Također postoje primjeri uspješne primjene entomopatogenih nematoda u kontroli štetnih insekata koji se razvijaju na nadzemnim biljnim organima *Rhynchophorus ferrugineus* (Llàcer et al., 2009) i *Cydia pomonella* (Lacey et al., 2010).

Literatura

1. Ansari, M.A., Tirry, L. & Moens, M. (2004). Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for control of *Hoplia philantus*. *Biological Control* 31: 172-180.
2. Arthurs, S., Heinz, K.M. & Prasifka, J.R. (2004). An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. *Bulletin of Entomological Research* 94: 297-306.
3. Batalla-Carera, L. Morton, A. & Garcia del Pino, F. (2010). Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. *BioControl* 55: 523-530.
4. Brinkman, M.A. & Gardner, W.A. (2000). Possible antagonistic activity of two entomopathogens infecting workers of the red imported fire ant (Hymenoptera : Formicidae). *Journal of entomological science* 2: 205-207.
5. Campbell, J.F. & Gaugler, R. (1993). Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour* 155-169.
6. Choudhury, B.N. & Sivakumar, C.V. (2000). Biocontrol potential of *Mylonchulus minor* against some plant-parasites.

sitic nematodes. *Annals of Plant Protection Science* 8: 53-57.

7. Cuthbertson, A.G.S., Walters, K.F.A., Northing P. & Luo W. (2007). Efficacy of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) under laboratory and glasshouse conditions. *Bulletin of entomological research* 97: 9-14.

8. Ehlers, R.U. (2005). Forum on Safety and Regulations. In: Grewal, P.S. Ehlers, R.-U. and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. Wallington: CABI Publishing pp: 107-114.

9. Ehlers, R.-U. & Shapiro-Ilan, D. (2005). Mass production. In: Grewal, P.S. Ehlers, R.-U. and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. Wallington: CABI Publishing pp: 65-77.

10. García del Pino, F. & Morton, A. (2005). Efficacy of entomopathogenic nematodes against neonate larvae of *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae) in laboratory trials. *Biocontrol* 50: 307-316.

11. Gaugler, R., A. & Bilgrami A.L. (2004). Nematode behavior. pp. 2-3.

12. Glaser, R.W. & Farrell, C.C. (1935). Field experiments with Japanis beetle and its nematode parasite. *Journal of the New York Entomological Society* 43: 345-371-

13. Grewal, P.S. Ehlers, R.-U. & Shapiro-Ilan, D.I. (2005). *Nematodes as biocontrol agents*. Wallington: CABI Publishing pp: 1-489.

14. Griffin, C.T., Boemare, N.E. & Lewis, E.E. (2005). Biology and Behaviour. In: Grewal, P.S. Ehlers, R.-U. and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. Wallington: CABI Publishing pp: 47-63

15. Griffin CT, O'Callaghan K, & Dix I. A. (2001). Self-fertile species of *Steinernema* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes?. *Parasitology*. 122:181-186.

16. Hunt, D.J. (2007). Overview of taxonomi and systematics. In: Nguyen, K.B. and Hund, D.J. (eds.) *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. Brill, 27-57.

17. Johnign, S.-A. & Ehlers, R.-U. (1999). *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp and the effect of the food supply. *Nematology* 1: 717-726

18. Kaya, H.K. (2002). Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler, E. (ed.), *Entomopathogenic Nematology*, 189-204.

19. Koppenhöfer, A.M. & Grewal, P.S. (2005). Compatibility and interactionnns with agrochemicals and others. In: Grewal, P.S. Ehlers, R.-U. and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. Wallington: CABI Publishing pp: 363-381.

20. Koppenhöfer, A.M. & Kaya, H. K. (1997). Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grab control. *Biological Control* 8: 131-137.

21. Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K. & Taormino S.P. (1995). Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1995;65:193-199.

22. Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. & Vails, P. (2001). Insects pathogens as bicontrol agents: do they have a future?. *Biological Control* 21: 230-248.

23. Lacey, L. & Georgis R. (2012). Entomopathogenic nematodes for control of insects pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology* 44(2): 218-225.

24. Llacer, E. Martinez de Altube, M.M. & Jacas J.A. (2009). Evaluation of the efficacy of *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in Phoenix canariensis. *BioControl* 54: 559-565.

25. Premachandra , W.T.S.D, Borgemeister C., Berndt , O., Ehlers R.-U. & H.-M. Poehling (2003). Combined releases of entomopathogenic nematodes and the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* to control soil-dwelling stages of western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. *BioControl* 48: 528-543.

26. Riga, E., Lacey, L.A., Guerra, N. & Headrick, H.L. (2006). Control of the Oriental Fruit Moth, *Grapholita molesta*, Using Entomopathogenic Nematodes in Laboratory and Fruit Bin Assays. *Journal of Nematology* 38, 168-171.

27. Schroer, S. & Ehlers, R.-U. (2005). Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Biological Control* 33: 81-86.

28. Shapiro-Ilan, D.I., Han, R. & Dolinski, C. (2012). Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology* 4: 206-217.

29. Shapiro-Ilan, D.I, Morales-Ramos JA, Rojas MG & Tedders WL (2010). Effects of a novel entomopathogenic nematode-infected host formulation on cadaver integrity, nematode yield, and suppression of *Diaprepes abbreviatus* and *Aethina tumida*. *Journal of Inverte Pathology*. 103(2):103-8.

30. Stock, S.P. & Hunt, D.J. (2005). Morphology and Systematics of Nematodes used in Biocontrol. In: Grewal, P.S. Ehlers, R.-U. and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents* Wallington: CABI Publishing pp: 3-43.

31. Toepfer, S. Peters, A., Ehlers, R.-U. & Kuhlmann, U. 2008. Comparative assessment of the efficacy of entomopathogenic nematode species at reducing western corn rootworm larvae and root damage in maize. *Journal of applied Entomology* 132: 337-348.

32. Tomalak, M., Piggott, S., & Jagdale, G.B. (2005). Glasshouse application. In: Grewal, P.S. Ehlers, R.-U. and Shapiro-Ilan, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. Wallington: CABI Publishing pp: 191-214.

33. Williams, C.D., Dillon, A.B., Harvey, C.D., Hennessy, R., Mc Namara L. & Griffin C.T. (2013). Control of major pest of forestry, *Hyllobius abietis*, with entomopathogenic nematodes and fungi using eradican and prophylactic strategies. *Forest Ecology and Management* 305, 212-222.

34. Wilson, M.J. & Gaugler, R. (2000). Terrestrial molusc pests. In: Lacey, L. and Kaya, H.K. (eds.) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp 787-804.

35. Yeates, G. W., Bongers, T., De Goede, R. G. M., Freckman, D. W. & Georgieva S. S. (1993). Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera - An Outline for Soil Ecologists. *Journal of Nematol*. 1993 Sep; 25(3): 315-331.